Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. H. Schweitzer

UNTERSUCHUNG ZUM POLYMORPHISMUS DER ALPHA-L-FUCOSIDASE (E.C.3.2.1.51) IN NORDRHEIN-WESTFALEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

THOMAS NETZER

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0073

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. H. Schweitzer

UNTERSUCHUNG ZUM POLYMORPHISMUS DER ALPHA-L-FUCOSIDASE (E.C.3.2.1.51) IN NORDRHEIN-WESTFALEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

THOMAS NETZER

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf "

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.Straßburg

Referent

gez.: Prof.Dr.Schweitzer

Korreferent

gez.: Prof.Dr.Brüster

UNTERSUCHUNG ZUM POLYMORPHISMUS DER ALPHA-L-FUCOSIDASE (E.C.3.2.I.5I) IN NORDRHEINWESTFALEN

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG
I.I Ziel der Untersuchung
I.2 Entdeckung von Alpha-L-Fucosidase
I.3 Funktion im Stoffwechsel
I.4 Pathophysiologie und Klinik
I.5 Darstellung und Nomenklatur der Phänotypen und Genotypen des Alpha-L-Fucosidase-Polymorphismus
I.6 Chromosomale Lokalisation und Kopplungsbeziehung der Allele
2. MATERIAL UND METHODEN
2.I Untersuchungsgut
2.2 Vorbereitung der Leukozytenlysate für die Isoelektrische Fokussierung
2.3 Vorgehen bei der Isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen
2.4 Darstellung der Phänotypen
3. ERGEBNISSE
3.I Beschreibung der drei Phänotypenbandenmuster
3.2 Phänotypenhäufigkeit und Genfrequenzen der untersuchten Bevölkerungsstichprobe
3.3 Familienuntersuchungen
3.4 Herstellung der Leukozytenlysate
3.5 Neuraminidasebehandlung
3.6 Probenapplikation
3.7 Einfluß von Alterung der Proben auf das Zymogramm

4. DISKUSSION
4.1 Vergleich der leukozytären Alpha-L-Fucosidase mit der anderer Gewebe
4.2 Vergleich der Allelfrequenzen in verschiedenen Populationen
4.3 Vererbungsmodus der Allele
4.4 Anwendbarkeit des Alpha-L-Fucosidase-Allele-Systems in der forensischen Paternitätsserologie
5. ZUSAMMENFASSUNG
6. LITERATUR

I. EINLEITUNG

I.I Ziel der Untersuchung

Aus der Literatur sind bislang nur wenige populationsgenetische Daten über den Polymorphismus der Alpha-L-Fucosidase (Abkürzung: Fuc) bekannt:
Von TURNER (1975) in Amerika, von CORNEY (1977) in England und von SPINDLER (1978) in Deutschland (Hessen).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, Untersuchungen zum Polymorphismus der Fuc an einer Bevölkerungsstichprobe aus Nordrheinwestfalen durchzuführen. Außerdem soll die Anwendbarkeit des Fuc-Allele-Systems für die Routine der Paternitätsserologie überprüft werden.

I.2 Entdeckung von Alpha-L-Fucosidase

LEVVY und MCALLAN konnten erstmals 1961 Fuc-Aktivität bei verschiedenen Säugetieren (Ratten, Schafen, Schweinen) feststellen.
Ein Abfall der Enzymaktivität nach Kastration der Ratten und ein signifikanter Anstieg nach der Menopause im Vaginalabstrich wiesen auf eine Kontrolle der Fuc-Aktivität durch das Endokrinum hin. Im Unterschied zur Beta-Glucuronidase und Alpha-Mannosidase zeigte die Fuc keinen Anstieg der Aktivität in malignen Geweben (z.B. Zervixkarzinom).
Weitere Alpha-L-Fucosidase-Aktivität wurde bis heute in menschlichen Leukozyten, AVILA et al (1974), HIRSCHHORN et al (1976), TROOST et al (1976) u.a., Fibroblasten der Haut, ZIELKE et al (1972), DAWSON et al (1976), BUTTERWORTH et al (1977) u.a., Alveolarmakrophagen, SCHARFMANN et al (1975), Amnionzellen, ZIELKE et al (1972), MATSUDA et al (1975) u.a., Serum und Plasma, ZIELKE et al (1972), KOLIBABA et al (1975), ALHADEFF et al (1978) u.a., Urin, PATEL et al (1976), PRICE et al (1977),

TROOST et al (I976) u.a., Tränenflüssigkeit, LIBERT et al (I976), Speichel, SHIZUKUISCHI et al (I977), Fruchtwasser, WIEDERSCHAIN et al (I97I), MATSUDA et al (I975) u.a., Leber, Niere, Milz, Pankreas, Herz, Gehirn, Plazenta, Skelettmuskulatur und fetale Organe, ROBINSON et al (I973), WIEDERSCHAIN et al (I973,I977), DI MATTEO et al (I976), DAWSON et al (I976),HIRSCHHORN et al (I976), CHESTER et al (I977), ALHADEFF et al (I975, I976,I977,I978) u.a. gemessen.
Keine Fuc-Aktivität wurde in Erythrozyten beobachtet (HARRIS und HOPKINSON,I976).
Aktivitätsbestimmungen im Fruchtwasser zeigten einen Anstieg bis zu der II.-I2. Schwangerschaftswoche. Danach fielen die Werte bis zum Ende der Gravidität wieder ab, waren bei Neugeborenen jedoch immer noch um ca. 40 % höher als bei Erwachsenen (WIEDERSCHAIN et al,I97I).
Keine oder nur sehr geringe Aktivität wurde bei Fucosidose (hereditäre Enzymopathie) festgestellt (TROOST et al,I976).
WOODS (I976) und DI MATTEO et al (I976) untersuchten gesunde Personen mit sehr niedriger Plasma-und Serumaktivität, deren leukozytäre Aktivität jedoch im Normbereich lag. Sie vermuten einen eigenen autosomal dominanten Charakter dieser Variante ohne pathologische Auswirkungen.
Heterozygote für Fucosidose zeigten zusätzlich eine um 50 % reduzierte Fuc-Aktivität in Leukozyten (BERATIS et al,I975).

I.3 Funktion im Stoffwechsel

Im menschlichen Organismus spielt die Fuc eine wichtige Rolle im Metabolismus Fucose (6-Desoxy-L-Galaktose)-enthaltender Glycolipide, Glycoproteine, Blutgruppensubstanzen und Immunglobuline.
Untersuchungen von WIEDERSCHAIN et al (I97I, I973) und

DAWSON et al (1977) zeigen, daß die Fuc hochspezifisch für solche Substanzen ist, die diesen 6-Desoxy-zucker als terminales Ende ihrer prosthetischen Gruppe in Alpha-Stellung zur Position 2 der Galaktose oder Position 3, 4 oder 6 des N-acetyl-D-glucosamin (z.B. Disaccharide der Struktur Fucose-Alpha-(I-6)-N-acetyl-D-glucosamin) besitzen.
Sie gehen in ihren Untersuchungen von einer einzigen Form der Fuc aus, die sowohl hydrophile Substrate wie Oligosaccharide als auch hydrophobe, membrangebundene Substrate wie Glucosphingolipide hydrolysiert.
Eine Trennung des Enzyms in eine lösliche und eine membrangebundene Form, wie sie für die Beta-Glucosidase beschrieben wird, schließen sie aus. Die Wirkung einer einzigen Fuc auf unterschiedliche Zustände von Substraten wird durch eine Änderung im "physiko-chemischen" Status des Enzyms, z.B. durch Emulgatoren wie die Gallensäuren, erklärt.
WIEDERSCHAIN et al (1971, 1973) beschreiben dagegen zwei Formen der Fuc mit unterschiedlicher Substratspezifität. Die eine Komponente katalysiert die Hydrolyse Alpha I-2, I-3 und I-4 glycosidisch gebundener Fucose, die andere Form kann nur Alpha I-2 und I-4 Bindungen spalten.
Für das Ergebnis von WIEDERSCHAIN et al spricht, daß ein Defekt der Fuc (Fucosidose) sich ebenfalls in zwei unterschiedlichen Formen, einer infantilen und einer juvenilen Form, manifestiert.
Die Heterogenität dieser Enzymopathie könnte jedoch auch durch eine Mutation entstanden sein:
Mutation eines Gens--▶ Änderung eines Enzyms--▶ Veränderung von Molekülen--▶ klinische Manifestation (Fucosidose I und 2) (TROOST et al, 1976).
Der genaue Enzymmechanismus ist bis heute allerdings noch nicht geklärt. Ein Grund dafür ist sicher, daß die Bedeutung der Fuc für den menschlichen Organismus erst 1966 durch die Entdeckung des Krankheitsbildes erkannt wurde (DURAND et al, 1966).

I.4 Pathophysiologie und Klinik

Fucosidose ist eine seltene, autosomal rezessiv erbliche Stoffwechselanomalie durch einen Defekt der lysosomalen Alpha-L-Fucosidase. Diese Enzymopathie trägt auch die Bezeichnung "Pseudo-Hurler" oder "Hurler-Variante", da sie klinisch und radiologisch Merkmale der Mucopolysaccharidosen aufweist, die Ausscheidung von Mucopolysacchariden im Urin jedoch normal ist.
Da sie neben den Merkmalen der Mucopolysaccharidosen auch solche der Sphingolipidosen besitzt, wird sie heute allgemein in die Gruppe der Mucolipidosen eingereiht (VOELZ et al,I97I).
Das Krankheitsbild wurde erstmals von DURAND et al (I966) an zwei Kindern eines italienischen Ehepaares beschrieben. Der eigentliche enzymatische Defekt der DURAND-Patienten wurde erst später von VAN HOOF und HERS (I968) festgelegt und mit Fucosidose bezeichnet.
Dieser Funktionsverlust der Fuc führt zu einer Akkumulation von Fucolipiden, Fucoglycoproteinen und Fucopolysacchariden in fast allen Organen (DURAND et al, I968,I969, I97I, LOEB et al,I969, DAWSON et al,I97I,I972,I976, VAN HOOF et al,I973) und zur Ausscheidung dieser Substanzen im Urin (STRECKER et al,I977).
Während DURAND (I966) die Krankheit noch als gravierenden Defekt der frühen Kindheit mit letalem Ausgang im Prämaturium beschrieb, zeigten PATEL et al (I972), KOUSSEFF et al (I973,I976) und GATTI et al (I973) eine zweite Form der klinischen Manifestation auf.
Diese genetische Heterogenität der Fucosidose ist heute allgemein anerkannt, so daß die Krankheit in eine infantile und juvenile Form unterteilt wird.

Führende Symptome und Befunde sind (nicht alle müssen vorhanden sein) :
Plumpe, entfernt "Hurler-ähnliche" Gesichtszüge mit verbreiterter Nasenwurzel, Makroglossie und Knochendeformitäten (Kyphoskoliose, schnabelförmige Lumbalwirbel u.a.); verzögerte psychomotorische Entwicklung mit

progressiver Spastizität (z.B. spastische Paraplegie); Hepatomegalie, Hepatosplenomegalie, Kardiomegalie und Dysfunktion der Gallenblase; verdickte Haut, Angioceratoma corporis diffusum und Hyperhidrosis mit hoher Salzkonzentration im Schweiß; zunehmender Gewichtsverlust bis zur Kachexie und rezidivierende Infekte der Luftwege bis zur Bronchopneumonie, die sehr oft letal endet. Elektronenmikroskopisch zeigt die Leber speichernde Lysosomen mit lamellären (Glycolipid)- und retikulären (Mucopolysaccharid-Protein)- Einschlüssen, sowie sog. opake (Neutralfett)-Kugeln, die als runde oder ovale Vakuolen imponieren (FREITAG et al, 1971). Ähnliche Strukturen finden sich in den Schwannschen Zellen und Neuronen. Besonders auffällig ist eine Degeneration der Gliazellen in der weißen Substanz des zerebralen Cortex (BUGIANI et al,1976, TROOST et al,1977).

Die juvenile Form der Fucosidose (Typ 2) unterscheidet sich von der infantilen Form (Typ I) im wesentlichen durch drei Punkte:

I. Langsamere Progredienz, die ein Überleben bis in das Erwachsenenalter ermöglicht. Patienten vom Typ I kommen dagegen schon vor dem 5.-6. Lebensjahr ad exitum.

2. Normaler oder erniedrigter Elektrolytgehalt (NaCl) im Schweiß.

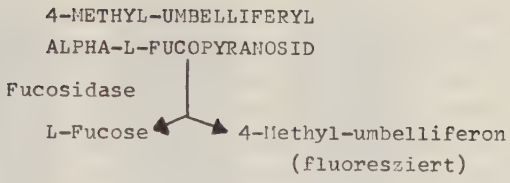
3. Angioceratoma corporis diffusum, das bisher nur beim Typ 2 gefunden wurde. Es bestünde allerdings die Möglichkeit, daß diese Hautveränderung auch beim Typ I aufträte, wenn die Patienten ein höheres Lebensalter erreichten.

Zur Diagnose und Differentialdiagnose gegenüber anderen Mucopolysaccharidosen gehört, neben normaler Mucopolysaccharidausscheidung,vor allem die Bestimmung der Fuc-Aktivität in Fibroblasten der Haut und Leukozyten.

Beide Zellarten sind ebenfalls für die Diagnose von Heterozygoten für Fucosidose geeignet; ein wichtiger Punkt bei der genetischen Beratung von Ehepaaren, da das statistische Wiederholungsrisiko für Geschwister von Kranken bei autosomal-rezessiven Erbleiden 25 % beträgt, wenn die Eltern heterozygot für die Krankheit und damit phänotypisch gesund sind.
Die Feststellung von Enzymaktivität im Fruchtwasser, Amnionzellen und Plazenta bietet zusätzlich die Möglichkeit der pränatalen Diagnose der Enzymopathie, deren diagnostische Grundlage die Amniozentese in der I4.-I6. Schwangerschaftswoche ist.
Zu diesem Zeitpunkt ist noch ausreichend Fuc-Aktivität vorhanden, so daß ein Defekt noch zu diagnostizieren ist. Außerdem kann eine Interruptio aus genetischer Indikation innerhalb des vom Bundesverfassungsgericht gesteckten Zeitrahmens vorgenommen werden (Entscheidung des BVG vom 25.2.I975). Die Bestimmung der Fuc-Aktivität an kultivierten Amnionzellen dauert im Mittel eine bis vier Wochen, so daß die 2o. Schwangerschaftswoche bis zur endgültigen Diagnose nicht überschritten wird.

I.5 Darstellung und Nomenklatur der Phänotypen und Genotypen des Alpha-L-Fucosidase-Polymorphismus

Die Fucosidase besteht aus verschiedenen Isoenzymen. Die Darstellung dieser Isoenzyme wurde erst durch die Entdeckung des Substrates 4-Methyl-umbelliferyl-alpha-Fucopyranosid (4-Me-Umb-Fuc) möglich.
Das Enzym spaltet L-Fucose von obigen Substrat ab, wodurch der fluoreszierende Farbstoff 4-Methyl-umbelliferon frei und am jeweiligen Enzymspot sichtbar wird:



(nach HARRIS und HOPKINSON,I976)

Durch Cellulose-Azetat-Elektrophorese, Stärkegel-Elektrophorese und Isoelektrischer Fokussierung (IEF) konnten Enzymmuster der Fuc in zahlreichen Geweben, z.B. in Leukozyten (TURNER et al, I974), Leber (ALHADEFF et al, I974,I975,I978), Serum und Plasma (ALHADEFF et al, I978), Fibroblasten (CHRISTOMANOU et al, I977), Plazenta (DI MATTEO et al, I976), Niere, Herz, Gehirn (DI MATTEO et al, I978), Milz (TURNER et al, I975), fetaler Leber (ALHADEFF et al, I976) dargestellt werden.

Die IEF, mit der die Darstellung der Isoenzyme am besten gelang, trennt Substanzen (Peptide, Proteine, Enzyme u.a.) aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte (pI-Werte). Es wird hier also nur nach einem stoffspezifischen Kriterium getrennt, während bei der herkömmlichen Elektrophorese mindestens zwei Merkmale entscheidend sind: Molekülgröße und Nettoladung. Letztere wird über den konstanten pH-Wert des jeweiligen Puffers festgelegt. Bei der IEF liegt dagegen ein pH-Gradient vor. Solche Gradienten gewinnt man durch Trägerampholyte, die aus mehreren Aminosäuren mit unterschiedlichen pI-Werten bestehen. Stabilisierendes Medium ist z.B. Polyacrylamid-Gel (PAG).
Der Vorteil der IEF ist außer der gesteigerten Nachweisempfindlichkeit, die weitgehende Unabhängigkeit der Probenaufgabestelle.

Ein Polymorphismus der Fuc wurde erstmals von TURNER et al (I975) an Leukozyten beschrieben.
Die IEF zeigte drei verschiedene Phänotypen, die mit

Fuc(I), Fuc(2) und Fuc(2-I) bezeichnet wurden, wobei Fuc(2) und Fuc(2-I) erst nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (NA) zuverlässig identifiziert werden konnten (Abb.I). Sie erklären den Einfluß der NA durch die Existenz unterschiedlicher Mengen von Sialinsäureresten (N- und O-substituierte Neuraminsäuren) im Fuc-Molekül.

Die drei Phänotypen konnten durch zwei häufige Allele $\underline{Fuc}^{I}$ und $\underline{Fuc}^{2}$ an einem autosomalen Genlocus erklärt werden.

Familienuntersuchungen ließen an einen autosomal kodominanten Erbgang denken. Eine X-chromosomale Vererbung konnte ausgeschlossen werden, da eine Übertragung des $\underline{Fuc}^{2}$- Allels von Vater auf Sohn beobachtet wurde (TURNER et al, I975).

Spätere Untersuchungen von TURNER et al (I975) an einer Familie mit Fucosidose zeigten jedoch, daß der bisher angenommene Vererbungsmodus der leukozytären Fuc mit zwei Allelen allein nicht beschrieben werden kann. Sie fanden folgende phänotypische Konstellationen:

I. Mutter Fuc(2), Vater Fuc(2-I), Tochter Fuc(I) und

2. Mutter Fuc(I), Vater Fuc(2), Sohn Fuc(I).

Die Phänotypen dieser Kinder können nur durch die Existenz eines "stummen" Allels $\underline{Fuc}^{0}$ am Fuc-Locus erklärt werden (KÖMPF, I980).

Das Allel wurde als "stumm" bezeichnet, da kein Produkt mit der IEF nachgewiesen werden konnte.

Die Mutter der I. Familie und der Vater der 2. Familie hatten in der IEF den Phänotyp Fuc(2) und demnach den Genotyp $Fuc^{2}Fuc^{0}$. Die Fuc-Aktivität war bei diesen $\underline{Fuc}^{0}$- Trägern um 50 % reduziert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Fuc die Phänotypen Fuc(I), Fuc(2) und Fuc(2-I) und die Genotypen $Fuc^{I}Fuc^{I}$, $Fuc^{2}Fuc^{2}$, $Fuc^{2}Fuc^{I}$, $Fuc^{2}Fuc^{0}$, $Fuc^{I}Fuc^{0}$ und $Fuc^{0}Fuc^{0}$ besitzt.

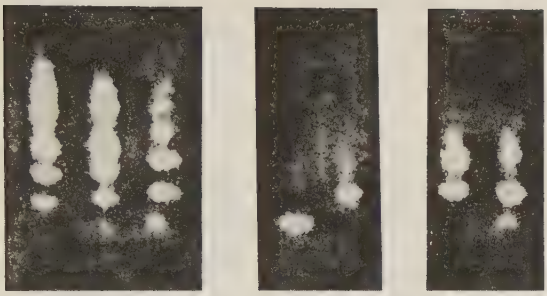


Abb. I Fuc-Phänotypen I, 2-I und 2 nach IEF
+ = mit NA behandelt; - = ohne NA behandelt
(nach TURNER et al, I975)

I.6 Chromosomale Lokalisation und Kopplungsbeziehung der Allele

Die Lokalisation der Allele $\underline{Fuc}^I$ und $\underline{Fuc}^2$ auf Chromosom A-I wurde erstmals von TURNER et al (I975) durch Segregationsanalysen an Somazellhybriden der Maus gezeigt.
Die Experimentalbefunde von COOK et al (I977) und RAO et al (I979) konnten diese Lokalisation bestätigen.
Insgesamt konnten dreizehn genetische Marker ermittelt werden. Der Fuc-Genort lag in unmittelbarer Nähe von 6-PGD, PGM_I, Rh, AK_2 und ENO_I auf dem kurzen Arm (p-Segment) von Chromosom A-I.
Die Auswertungen von CORNEY et al (I977) anhand von 53 Familien mit 58 Kindern zeigten eine enge Kopplungsbeziehung zwischen der Fuc und dem Rh-System; nur in einem Fall fand eine Rekombination statt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.I Untersuchungsgut

Untersuchungsgut ist die in den Leukozyten vorhandene Alpha-L-Fucosidase.
Zur Herstellung der Leukozyten-Lysate wurde IO ml venöses Blut durch Punktion gewonnen und mit 0.05 ml Heparin oder I ml Na-citrat-Lösung ungerinnbar gemacht.
Konnten die Proben nicht innerhalb von 6 Stunden verarbeitet werden, so wurden sie bis zum nächsten Tag im Kühlschrank bei + 4 °C aufbewahrt.
Das Plasma wurde durch Zentrifugieren (500 g/IO min) von den Erythrozyten getrennt, der leukozytenreiche Überstand vorsichtig abpipettiert und mit einer 0.9 % NaCl-Lösung im Verhältnis I:I gemischt. Anschließend wurde 7 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang kann zweimal wiederholt werden.
Kontaminierende Erythrozyten können gegebenfalls noch mit 0.2 % NH_4Cl-Lösung lysiert werden.
Zu den Leukozyten-Pellets wurde 0.I ml Aqua dest. gegeben. Die Pellets wurden dann durch fünf-bis sechsmaliges Einfrieren bei -80 °C für 5-IO min und Auftauen bei Zimmertemperatur lysiert, einige Minuten bei 2000 g zentrifugiert und der stromafreie Überstand für die Versuche verwendet.
Neben dieser von TURNER et al (I975) beschriebenen Lysatherstellung, wurde die weniger arbeitsintensive Methode von SPINDLER (I978) ausprobiert: Die Pellets wurden ein-bis zweimal für eine Stunde bei -20 °C eingefroren.

Alternativ zu dem Verfahren der Isolation der Leukozyten nach dem Prinzip der Differentialzentrifugation, wurde ein Verfahren angewandt, welches das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten ausnutzt:
Heparinisiertes Blut wurde mit 6 % und 3 % Dextran (Mol.-Gew. 200 000-300 000) im Verhältnis 5:I, 2:I und I:2

gemischt, 45-60 min bei Zimmertemperatur stehengelassen und der leukozytenreiche Überstand abgezogen. Die Leukozytenlysate wurden wie oben beschrieben hergestellt.

2.2 Vorbereitung der Leukozytenlysate für die Isoelektrische Fokussierung

Zur sicheren Differenzierung der Phänotypen müssen die Leukozytenlysate mit Neuraminidase (NA) vorbehandelt werden (TURNER et al, 1975).
Zunächst wurde das von TURNER et al (1975) beschriebene Verfahren angewendet: Zu 20 ul Lysat wurden 10 ul NA aus Vibrio cholera I E/ml (Behring-Werke) und 5 ul eines 10 mM Phosphat-Citronensäure-Puffers vom pH 4.8 (0.2 M $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ + 0.1 M Citronensäure) gegeben.
Die Intensität und Auftrennung der Isoenzymbanden war jedoch wenig befriedigend. Deshalb wurde sowohl die Menge an Lysat als auch an NA variiert:
Zu 20, 30 und 40 ul Lysat wurden unterschiedliche Mengen von NA (5-30 ul) gegeben. Die Puffermenge wurde dem Lysat im Verhältnis 4:1 angepaßt.
Die Inkubation der Proben erfolgte in mit Parafilm verschlossenen Glasröhrchen bei +26 °C für 17-20 Stunden.

2.3 Vorgehen bei der Isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen

Trennmedium

Zur Analyse der Fuc-Isoenzyme wurden fertige Gele vom Typ " Ampholine PAG-plates^{R}", pH-Bereich 3.5 - 9.5 und Abmessungen von 245 x 110 x 1 mm, der Firma LKB benutzt.

Elektrofokussierkammer

Die Elektrofokussierkammer war vom Typ "FBE 3000^{R}" der Firma Pharmacia.

Stromversorgung

Das Stromversorgungsgerät besaß eine kontinuierlich regelbare und stabilisierbare Spannung von IO-2000 V Gleichstrom, eine Stromstärke von 2-200 mA und eine Leistung von I-IIO W .

Vorbereiten der Trennung

Auf die Kühlplatte wurde zunächst ca. 3 ml 30 % Isopropylalkohol verteilt, um einen besseren Wärmeübertritt zwischen Gel und Kühlplatte zu erreichen. Dann wurde die Gelplatte vorsichtig aufgelegt. Zur Vermeidung örtlicher Überhitzung müssen Luftblasen unter dem Gel vermieden werden.
Die Elektrodenstreifen der Stärke Whatman Nr. I7 wurden mit der entsprechenden Elektrodenpufferlösung getränkt und ca. I cm vom Rand entfernt auf die Gelplatte gelegt.

Trennbedingungen für Fucosidase

Pharmalyte pH 3.5-9.5

Elektrodenlösung: Anode O.I mol/l H_3PO_4
Kathode I mol/l NaOH

Probe: Probenauftragsmenge 35-40 ul

Applikation in zwei Variationen:
I. Die Probe wird direkt auf das Gel in Form von 5 mm breiten Streifen aufgetragen.
2. Die Probe wird in ein Stück Whatman Filterpapier 3 M (5xIO oder IOxIO mm) aufgesaugt und auf die Gelschicht gelegt.

Auftragsort: 2.5-3 cm von "Kathode"
Um den optimalen Auftragsort der Proben zu ermitteln, wurden diese zunächst stufenweise über das Gel verteilt.

Kühltemperatur:	+ 6 °C
Trennbedingungen:	I300 V, 35 W, 50 mA
Trennzeit:	Gesamtlaufzeit I50 min Vorfokussierung 60 min Fokussierung 90 min (mit Filterpapier 60 min)

2.4 Darstellung der Phänotypen

Nach Auftrennung der Fuc-Isoenzyme durch die IEF werden diese durch 4-Methyl-umbelliferyl-alpha-L-Fucopyranosid sichtbar gemacht:
0.4 mg/ml (I.2 mM) 4-Methyl-umbelliferyl-alpha-L-Fucopyranosid wird in 0.I M Phosphat-Citronensäure-Puffer, pH 4.8, I0 min vor Beendigung der Fokussierung gelöst.
Ein Stück Filterpapier Whatman 3 M wird mit dieser Lösung getränkt und auf das fokussierte Gel unter Vermeidung von Luftblasen gelegt (sog. "Overlay-Technik").
Zusätzlich wird eine dünne Glasplatte aufgelegt, um einen engeren Kontakt zwischen Färbelösung und Gel zu erhalten.
Das Gel wird für 60 min bei + 37 °C inkubiert.
Nach der Inkubation wird die Gelplatte vorsichtig in einen 0.085 M Glycin-Carbonat-Puffer vom pH I0.5 getaucht.
Diese Alkalisierung beendet die enzymatische Hydrolyse und steigert die Fluoreszenz (TURNER et al, I975).
Die Darstellung der Phänotypen erfolgt im langwelligen (366 nm) UV-Licht.

3. ERGEBNISSE

3.I Beschreibung der drei Phänotypenbandenmuster

In dieser Untersuchung konnten unter den oben genannten Bedingungen der IEF drei Phänotypen der Fuc dargestellt werden (Abb.2).

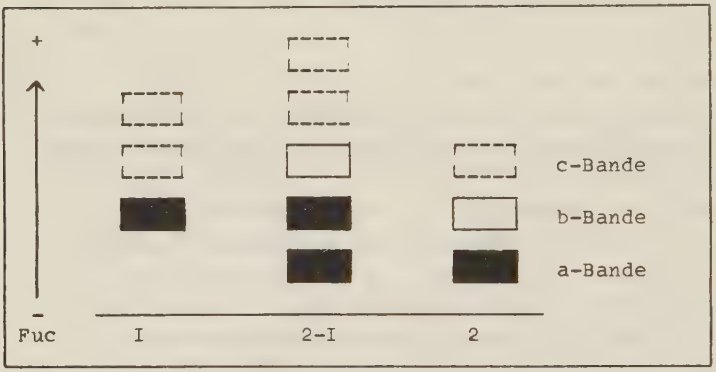


Abb. 2 Schematische Darstellung der Bandenmuster der drei Fuc-Phänotypen in der IEF.

Für serogenetische Zwecke kann von zwei autosomal kodomonanten Allelen $\underline{Fuc}^{I}$ und $\underline{Fuc}^{2}$ mit den Phänotypen Fuc(I), Fuc(2-I) und Fuc(2) ausgegangen werden.
Der häufigste Phänotyp Fuc(I) besitzt eine sehr intensive b-Bande mit weiteren "anodenwärts" gelegenen Isoenzymbanden, deren Färbeintensität mit der Entfernung von der "Kathode" abnimmt. In einigen Fällen stellt sich nur die b-Bande dar. Diese Variationen sind wahrscheinlich von der Konzentration der Proben abhängig (TURNER et al, I975).
Der seltene Phänotyp Fuc(2) hat eine sehr intensive a-Bande. Er kann zusätzlich eine b-Bande besitzen,

wobei die a-Bande jedoch immer die intensivere von beiden ist. Eine sehr schwache c-Bande ist sehr oft weiter "anodenwärts" zu erkennen. In seltenen Fällen stellt sich nur die a-Bande dar.
Der Phänotyp Fuc(2-I) weist zwei annähernd gleichstarke a- und b-Banden auf, die in Höhe der Hauptbanden von Fuc(I) und Fuc(2) liegen. Meistens ist die b-Bande etwas intensiver dargestellt als die a-Bande, so daß er sich vom Phänotyp Fuc(2) leicht unterscheiden läßt. Einige Proben zeigen zusätzlich eine stärker ausgeprägte c-Bande, so daß man ein typisches Dreibandenmuster erkennen kann.
Oberhalb dieser drei Hauptbanden stellen sich weitere sehr schwache Isoenzymbanden dar. Diese "Minorbanden" sind in der Regel sehr schwach oder überhaupt nicht vorhanden, so daß sie nicht zur Differenzierung der Phänotypen herangezogen wurden.
Zusätzlich wurden Versuche ohne Vorbehandlung der Proben mit Neuraminidase durchgeführt. Eine zuverlässige Differenzierung der Phänotypen, besonders Fuc(2) und Fuc(2-I), war jedoch nicht möglich.
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von TURNER et al (I975) führte ein Zusatz von NA zu einer Abnahme der Aktivität der weiter "anodenwärts" gelegenen Banden, während die Intensität der "kathodenwärts" gelegenen Isoenzymbanden zunahm. Damit stellten sich die zur Differenzierung notwendigen Hauptbanden eindeutig dar.

3.2 Phänotypenhäufigkeit und Genfrequenzen der untersuchten Bevölkerungstichprobe

Der untersuchte Stichprobenumfang betrug n=468, nichtverwandte, zufällig ausgewählte Personen aus Nordrheinwestfalen. Der überwiegende Teil waren Blutspender der Universitätsklinik Düsseldorf, die in Düsseldorf oder den umliegenden Ortschaften ansässig sind.
In den Tabellen I-3 sind die beobachteten und zu erwarteten Fuc-Phänotypenhäufigkeiten zusammengestellt.
Die Genfrequenzen wurden wie folgt berechnet:

$$f\ (\underline{Fuc}^{I}) = \frac{2\ Fuc(I) + Fuc(2\text{-}I)}{2n}$$

$$f\ (\underline{Fuc}^{2}) = \frac{2\ Fuc(2) + Fuc(2\text{-}I)}{2n}$$

Daraus ergaben sich folgende Genfrequenzen für die Fuc:

Gesamt :	$f\ (\underline{Fuc}^{I})$	= 0.7447
	$f\ (\underline{Fuc}^{2})$	= 0.2553
Männer :	$f\ (\underline{Fuc}^{I})$	= 0.7515
	$f\ (\underline{Fuc}^{2})$	= 0.2485
Frauen :	$f\ (\underline{Fuc}^{I})$	= 0.7292
	$f\ (\underline{Fuc}^{2})$	= 0.2708

Die aufgrund der Fuc-Phänotypenhäufigkeiten errechneten Genfrequenzen zeigen eine enge Übereinstimmung mit den nach dem HARDY-WEINBERG-Gesetz zu erwarteten Zahlen. Beobachtungswert und Erwartungswert weichen maximal um I.7 % voneinander ab. Es ergibt sich ein Chi-Quadrat-Wert von 0.3638. Damit besteht kein signifikanter Unterschied; bei einem Freiheitsgrad (der p-Wert liegt zwischen 50 % und 70 %), wie er bei zwei Allelen und drei Phänotypen zugrunde zu legen ist, hätte der Chi-Quadrat-Wert den Wert 3.84 übersteigen müssen.
Auch die Aufspaltung der Phänotypen getrennt nach Männer und

Frauen entspricht recht gut den Erwartungswerten. Die Abweichungen liegen im statistischen Zufallsbereich. Der Chi-Quadrat-Wert betrug für Männer 0.7428 und für Frauen 0.005. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Stichproben läge vor, wenn im Vergleich der Phänotypenhäufigkeiten bei zwei Freiheitsgraden der Chi-Quadrat den Wert 5.99 überstiegen hätte. Beide Mengen entstammen also der gleichen Grundgesamtheit.

PHÄNOTYP	n BEOBACHTET	n ERWARTET
Fuc(I)	262 (55.98%)	259.5 (55.5%)
Fuc(2-I)	I73 (36.97%)	I77.9 (38.0%)
Fuc(2)	33 (7.05%)	30.5 (6.5%)

Tab. I: Vergleich der beobachteten und zu erwarteten Phänotypenhäufigkeiten

PHÄNOTYP	n BEOBACHTET	n ERWARTET
Fuc(I)	I86 (57.4%)	I83.4 (56.6%)
Fuc(2-I)	II5 (35.5%)	I20.5 (37.2%)
Fuc(2)	23 (7.I%)	20.I (6.2%)

Tab. 2: Vergleich der beobachteten und zu erwarteten Phänotypenhäufigkeiten für Männer

PHÄNOTYP	n BEOBACHTET	n ERWARTET
Fuc(I)	76 (52.8%)	76.3 (53.0%)
Fuc(2-I)	58 (40.3%)	57.6 (40.0%)
Fuc(2)	I0 (6.9%)	I0.I (7.0%)

Tab. 3: Vergleich der beobachteten und zu erwarteten Phänotypenhäufigkeiten für Frauen

3.3 Familienuntersuchungen

Der Vererbungsmodus der Fuc wurde an I7 Familien mit 29 Kindern untersucht. Von den sechs zu erwarteten Elternpaarungen wurde nur die Kombination Fuc(2) x Fuc(2) nicht beobachtet.
Die Elternpaarungen und die Verteilung der Kinder-Phänotypen zeigt Tab. 4 .
Die Abweichungen der Erwartungswerte (in Klammern angegebene Zahlen) von den Beobachtungswerten liegen im statistischen Zufallsbereich. Die Chi-Quadrat-Werte überschreiten bei einem bzw. zwei Freiheitsgraden (FG) nicht die Werte der X^2_f-Verteilung von 3.84 bzw. 5.99 .
Die von TURNER et al (I975) beschriebene autosomal kodominante Vererbung der Fuc kann bestätigt werden.

Eltern	n	Phänotypen der Kinder I	2-I	2	n	FG	X^2
I x I	8	I2	-	-	I2		
I x 2-I	4	5(4)	3(4)	-	8	I	0.500
I x 2	2	-	3	-	3		
2-I x 2-I	2	I(I.25)	2(2.5)	I(I.25)	4	2	0.I00
2-I x 2	I	-	I(I)	I(I)	2	I	-
2 x 2	-	-	-	-	-		
	I7	I8	9	2	29		

Tab. 4 Verteilung der Phänotypen bei I7 Familien mit 29 Kindern aus Nordrheinwestfalen.

3.4 Herstellung der Leukozytenlysate

Um das Verfahren der Lysatherstellung zu vereinfachen bzw. abzukürzen, wurde Zeit und Anzahl der Gefriervorgänge variiert und zusätzlich das weniger arbeitsintensive Verfahren von SPINDLER (I978) ausprobiert.
Es ergaben sich folgende Ergebnisse:
Optimale Zymogramme zeigten sich erst nach fünfmaligem Einfrieren, wobei 5 min pro Gefriervorgang ausreichten.
Proben, die bis zu fünfzehnmal bei -80 °C eingefroren wurden, konnten in der IEF ebenfalls noch ausreichend differenziert werden. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Pellets führt demnach zu keinem wesentlichen Aktivitätsverlust der Fuc.
Ein- bzw. zweimaliges Einfrieren bei -20 °C für eine Stunde ergab keine befriedigende Ergebnisse.
Sowohl die Intensität der Färbung als auch die Auftrennung der Isoenzymbanden war ungenügend. Die Phänotypen waren nur schwer oder überhaupt nicht zu differenzieren. Versuche mit diesen Pellets in einem Agarose-Gel zeigten, daß die größte Enzymaktivität noch in den zusammengeballten Leukozyten und nicht im Lysat vorzufinden war. Dieser Gefriervorgang reichte zur optimalen Freisetzung der Fuc nicht aus.
Damit bleibt die Lysatherstellung ein sehr arbeitsintensives Verfahren. Es sei in diesem Zusammenhang jedoch auf eine Methode hingewiesen, die den Arbeitsgang erheblich verkürzen würde: Die "Zerstörung" der Zellmembran durch Ultraschall-Vibration (TROOST et al,I976).

Eine Reduktion der Blutmenge von IO ml auf 4 ml gelang durch ein Verfahren, das das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten ausnutzt: Blut wurde mit 6 % und 3 % Dextran im Verhältnis 5:I, 2:I und I:2 gemischt.
Dieses Verfahren der Leukozyten-Isolation basiert auf einer

Arbeit von SKOOG et al (1955).
Bei einer Blutmenge von 10 ml waren die Pellets im Vergleich zur Differentialzentrifugation wesentlich kompakter, d.h. es konnten noch mehr Leukozyten isoliert werden. Dieses führte zu einer intensiveren Anfärbung der Banden in der IEF, so daß die Ablesung der Zymogramme erleichtert wurde.
Ausreichend Leukozyten konnten bis zu 4 ml Blut isoliert werden. Die Phänotypen waren in jedem Fall zu differenzieren. Eine weitere Reduktion der Blutmenge führte nicht immer zu Ergebnissen und wurde deshalb aufgegeben.
Sehr zuverlässig war in allen Versuchen das Verhältnis Blut : Dextran = 1 : 2. Allerdings befanden sich immer sehr viele Erythrozyten im Überstand, so daß noch mit 0.2 % NH_4Cl lysiert werden mußte.
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SKOOG et al (1955) war das Verhältnis Blut : Dextran = 5 : 1 am wenigsten mit Erythrozyten kontaminiert, führte jedoch bei 4 ml Blut nicht immer zu optimalen Ergebnissen (z.T. sehr schwache Banden).
Die Mischung Blut : Dextran = 2 : 1 zeigte nur bei einer Dextrankonzentration von 3 % gute Ergebnisse, während 6 % Dextran ab 8 ml Blut sehr unzuverlässig war.
Eine Verlängerung der Sedimentationszeit von einer auf drei Stunden führte zu einer weiteren Reduktion der Erythrozyten im Überstand. Die Zymogramme wurden dadurch nicht beeinflußt.

3.5 Neuraminidasebehandlung

Die Neuraminidasebehandlung der Leukozytenlysate mit der von TURNER et al (1975) beschriebenen Methode war wenig befriedigend und führte zu Fehlern bei der Ablesung der Zymogramme.
Durch eine unvollständige Auftrennung der am weitesten "kathodenwärts" gelegenen Banden wurden einige Proben als Fuc(2-I) differenziert, obwohl es sich um "anbehandelte" Fuc(I) Phänotypen handelte. Eine sichere Differenzierung der Phänotypen ist also nur durch eine vollständige NA-Behandlung der Proben gewährleistet.
Diese Problematik wird in Abb. 3 noch einmal schematisch dargestellt.
Eine optimale Intensität und Auftrennung der Isoenzymbanden wurde durch eine Erhöhung der Probenmenge von 20 ul auf 35-40 ul und der NA von IO ul auf I5-20 ul erzielt. Bei Mengen von 25-30 ul NA war durch das veränderte Volumenverhältnis Lysat/NA eine Abschwächung der Banden festzustellen.
Als weitere Parameter der NA-Behandlung wurden Inkubationszeit und -temperatur variiert. Weder eine Verlängerung der Inkubationszeit noch eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C führte zu besseren Ergebnissen. Es war sogar in beiden Fällen eine Abnahme der Fuc-Aktivität festzustellen, was sich an abgeschwächten Zymogrammen zeigte.

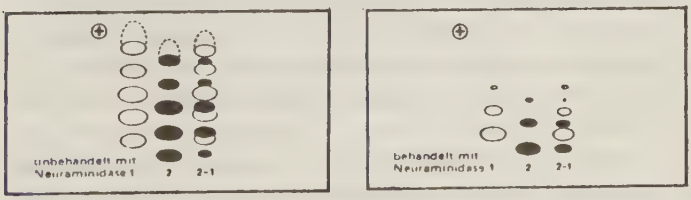


Abb. 3 Schematische Darstellung der Fuc-Phänotypen I, 2-I und 2 nach IEF mit und ohne Neuraminidase (nach TURNER et al,I975).

3.6 Probenapplikation

Die Überprüfung der Parameter Auftragungsort und -menge der Proben ergab folgende Ergebnisse:
Der optimale Auftragungsort konnte durch eine stufenweise Applikation der Proben über die gesamte Länge des Gels ermittelt werden. Er liegt 2.5-3 cm vom "Kathodenstreifen" entfernt. Proben, die weiter "anodenwärts" aufgetragen wurden, konnten nicht ausreichend analysiert werden, da sie z.T. an der Stelle ihres isoelektrischen Punktes lagen.

Die ermittelte Probenmenge betrug 40-45 ul. Sie wurde mit einer Mikroliterpipette in Form von 2.5-3 cm langen und 0.5 cm breiten Streifen direkt auf die Geloberfläche aufgetragen. Auf diese Weise konnten in einem Lauf ca. 20 Proben analysiert werden.
Die Applikation mit Filterpapierstücken lieferte weniger gute Ergebnisse. Einige Proben trennten sich überhaupt nicht auf, andere hatten sehr schwache Banden, so daß die Ablesung sehr schwierig war.

3.7 Einfluß von Alterung der Proben auf das Zymogramm

Einige Leukozyten-Pellets wurden bis zu 40 Tagen bei -20 ^{o}C in sterilen Glasröhrchen gelagert und in Abständen von einer Woche analysiert. Zum Vergleich wurden frische Proben derselben Probanden mitfokussiert.
Auch sechs Wochen alte Pellets wiesen noch ausreichend Fuc-Aktivität auf, so daß die Ablesung keine Schwierigkeiten bereitete. Ein Vergleich mit den frischen Proben zeigte, daß die Phänotypen Fuc(I), Fuc(2-I) und Fuc(2) auch wieder als solche erschienen und nicht verändert waren.
Proben, die nicht in Form von Pellets, sondern als fertige Leukozytenlysate (d.h. erst nach Auflösung der Zellmembran durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen) gelagert wurden, zeigten ein anderes Verhalten.
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SPINDLER (1978)

konnten die Proben bis zur 6. Woche analysiert werden. Die Intensität der Banden nahm jedoch mit zunehmendem Alter der Proben ab, was auf einen Aktivitätsverlust der Fuc hinweist. In einigen Fällen waren einzelne Banden kaum noch zu erkennen, so daß eine exakte Differenzierung der Phänotypen sehr schwierig war. Die Proben sollten deshalb in Form der Leukozyten-Pellets gelagert werden.

4. DISKUSSION

4.I Vergleich der leukozytären Alpha-L-Fucosidase mit der anderer Gewebe

Durch Cellulose-Azetat-Elektrophorese, Stärkegel-Elektrophorese und IEF auf Polyacrylamidgel konnten Isoenzymmuster der Fuc in zahlreichen Geweben dargestellt werden (s. Abschn. I.5).
Die Leber-Fuc zeigte in der Stärkegel-Elektrophorese 5-6 verschiedene Banden: Zwei wanderten zur Kathode, eine verblieb in der Nähe der Auftragungsstelle und zwei bis drei wanderten zur Anode (ALHADEFF et al, 1975). Die Fokussierung des Leber-Enzyms ergab sechs Isoenzymbanden mit den pI-Werten 6.9, 6.5, 6.1, 5.9, 5.7 und 5.5 (ALHADEFF et al, 1978).
Ähnliche Verteilungsmuster fanden sich auch in anderen Geweben. Lediglich die Serum-Fuc machte eine Ausnahme: Hier zeigten sich nur 2-3 Banden mit größerer Wanderungsgeschwindigkeit zur "Anode" (TURNER et al, 1974, 1975). Eine Vorbehandlung der zellulären Enzyme mit Neuraminidase führte zu einer verminderten Anfärbbarkeit der mehr "anodenwärts" gelegenen Banden, während die mehr zur "Kathode" gelegenden in ihrer Intensität zunahmen.
Die Serum-Fuc zeigte dagegen eine Verschiebung aller pI-Werte in den mehr alkalischen Bereich. Dieser Einfluß

der Neuraminidase kann durch die Existenz unterschiedlicher Mengen von Sialinsäureresten im Fuc-Molekül erklärt werden (ALHADEFF et al, 1978).
Die leukozytäre Fuc zeigte in der IEF 6-9 Isoenzyme mit drei verschiedenen Isoenzymmustern, die sich durch ihre Stabilität in zahlreichen Untersuchungen auszeichneten. Neben dieser Eigenschaft besitzt das Enzym eine gute Zugänglichkeit, eine quantitative Beziehung zwischen Gen und Genprodukt (Gen-Dosis-Beziehung) und in der IEF eine geeignete Nachweismethode. Damit erfüllt die leukozytäre Fuc wichtige Voraussetzungen nicht nur für einen Heterozygotentest, sondern auch für andere Untersuchungen (z.B. forensische Serologie).
TURNER et al (1975) konnten mit der Fokussierung auch in anderen Geweben (Leber, Gehirn, Milz und Plazenta) einen Fuc-Polymorphismus in gleicher Weise darstellen. Sie vermuten deshalb, daß die Fuc in diesen Geweben durch ein und denselben Genlocus codiert wird.

4.2 Vergleich der Allelfrequenzen in verschiedenen Populationen

Die Ergebnisse der populationsgenetischen Untersuchungen sind zum Vergleich mit den Angaben der Literatur in Tab. 5 wiedergegeben.

Land	n	Fuc^1	Fuc^2	Autoren
USA				TURNER et al(1975)
Weiße	194	0.753	0.247	
Schwarze	27	0.926	0.074	
England	109	0.75	0.25	CORNEY et al(1977)
BRD(Hessen)	355	0.7451	0.2549	SPINDLER (1978)
BRD(NRW)	468	0.7447	0.2553	Eigene Untersuchungen (1980)

Tab. 5 Vergleich der Fuc-Allelfrequenzen bei verschiedenen Populationen

Ein Polymorphismus der Fuc wurde erstmals von TURNER et al (1975) an einer nordamerikanischen Population beschrieben.
Von den insgesamt 221 untersuchten Personen waren 126 eingewanderte, osteuropäische Juden, 68 "Nicht-Juden" und 27 Schwarze.
Weitere Allelfrequenzen wurden von CORNEY et al (1977) in England und Schottland (n = 109) und SPINDLER (1978) in Hessen (n = 355) aufgestellt.
Das Kollektiv der vorliegenden Untersuchung betrug n = 468, nicht verwandte Personen aus Nordrheinwestfallen.
Bei einem Vergleich der populationsgenetischen Daten ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung; der Chi-Quadrat-Test der vier Bevölkerungsstichproben zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich der Phänotypenhäufigkeiten. Der Chi-Quadrat-Wert hätte bei zwei Freiheitsgraden den Wert 5.99 übersteigen müssen, erreicht aber nur maximal 2.16 .
Ein direkter Vergleich zwischen weißer und schwarzer Population zeigt allerdings einen Unterschied der Fuc-Allelfrequenzen. Die Phänotypen Fuc(2) und Fuc(2-1) sind mit einer $\underline{Fuc}^2$-Allelfrequenz von 0.074 in der schwarzen Population deutlich seltener vertreten.
Unterschiede von Genfrequenzen zwischen verschiedenen Bevölkerungen gehen allgemein zurück auf: Selektion, genetische Drift, Heterozygotenvorteil, Migration usw. .
Für die Seltenheit des $\underline{Fuc}^2$-Allels bei Schwarzen könnte nach TURNER et al (1975) eine Genvermischung ("Caucasian admixture") und das Fehlen dieses Allels bei den afrikanischen Vorfahren verantwortlich sein.
Diese Genvermischung und Genwanderung ("gene flow") zwischen ursprünglich unterschiedlichen Populationen führen damit zu einer Art "Verdünnungseffekt".
Sollte sich die Abwesenheit oder Seltenheit des $\underline{Fuc}^2$-Allels in der afrikanischen Bevölkerung bestätigen, so wäre der Fuc-Polymorphismus sicher ein nützlicher Parameter bei der Erforschung von Rassenmischungen.

4.3 Vererbungsmodus der Allele

Die Verteilung der Fuc-Phänotypen wurde in 98 Familien mit 218 Kindern aus 4 Kollektiven untersucht.
Bei den 4 Kollektiven handelt es sich um 27 Familien mit 77 Kindern aus England (CORNEY et al, 1977), um 18 Familien mit 34 Kindern aus den USA (TURNER er al, 1975), um 36 Familien mit 78 Kindern aus Hessen (SPINDLER, 1978) und 17 Familien mit 29 Kindern aus Nordrheinwestfalen (EIGENE UNTERSUCHUNGEN, 1980).
Eine Zusammenfassung aller bisher untersuchten Familien zeigt Tab. 6 .

Eltern	n	Phänotypen der Kinder I	2-I	2	n
I x I	32	63	--	--	63
I x 2-I	32	43	36	--	79
I x 2	10	--	20	--	20
2-I x 2-I	18	13	23	10	46
2-I x 2	6	--	5	5	10
2 x 2	-	--	--	--	--
	98	119	84	15	218

Tab. 6 Verteilung der Fuc-Phänotypen in 98 Familien mit 218 Kindern aus 4 Kollektiven.

Die Ergebnisse bestätigen den autosomal kodominanten Vererbungsmodus der Fuc mit zwei häufigen Allelen $\underline{Fuc}^{I}$ und $\underline{Fuc}^{2}$ an einem autosomalem Locus.
Mit Ausnahme der Kombination Fuc(2) x Fuc(2) wurden alle Möglichkeiten beobachtet. Diese Paarung hat jedoch lediglich einen Erwartungswert von 0.5 .
Neben den zwei häufigen Allele $\underline{Fuc}^{I}$ und $\underline{Fuc}^{2}$ existiert noch ein seltenes "stummes" Allel $\underline{Fuc}^{0}$, das sich gegenüber

den zuerst genannten rezessiv verhält; nur bei reinerbigen Trägern dieses $\underline{Fuc}^{0}$-Allels kommt es zur Manifestation der Fucosidose (TURNER et al, 1975).

4.4 Anwendbarkeit des Alpha-L-Fucosidase-Allele-Systems in der forensischen Paternitätsserologie

Grundlage für die Anwendbarkeit der vererbbaren Bluteigenschaften in der forensischen Paternitätsserologie ist die Konstanz der Merkmale während des ganzen Lebens, die Klärung des Erbgangs, der den Mendel'Regeln folgen muß, sowie die Sicherheit und Reproduzierbarkeit des serologischen Nachweises (Kriterien nach SCHWERD, 1975). Weitere wichtige Voraussetzungen sind Umwelt-und Lagerungsstabilität, leichte Zugänglichkeit des Untersuchungsmaterials, Typisierung der Phänotypen auch im Neugeborenenalter und Kenntnis von sog. "stummen" Allelen.

Das Fuc-System erfüllt zum größten Teil diese Bedingungen. Durch die Existenz in den Leukozyten ist die Fuc leicht verfügbar und ihre Gewinnung bereitet keine Schwierigkeiten. Auch bei Kleinkindern, bei denen oft nur sehr wenig Blut zur Verfügung steht, ist durch die Reduktion der Blutmenge eine Darstellung der Phänotypen möglich. Die Sicherheit und Reproduzierbarkeit des serologischen Nachweises liegt in der Technik der Bestimmung, das heißt Standardisierung der Methodik bei weitgehender Ausschaltung der Fehlermöglichkeiten. Die Fehlerquellen bei Laborarbeiten sind zahlreich: Falscher pH-Wert im Testansatz, Nichteinhaltung der Inkubationszeit und -temperatur, ungenügende Substratkonzentration u.a. .
Eine Besonderheit bei der Fuc ist die Abhängigkeit von der vollständigen Neuraminidasebehandlung.
Bei einer Phänotypenkonstellation Mutter Fuc(I), Kind Fuc(2-I), Präsumtivvater Fuc(I), wäre letztere als Erzeuger ausgeschlossen, da er das beim Kind nachgewiesene Merkmal $\underline{Fuc}^{2}$ nicht besitzt. Das ist jedoch nur

dann der Fall, wenn der Phänotyp Fuc(2-I) vollständig mit Neuraminidase behandelt wurde, da sich sonst fälschlicherweise ein "anbehandelter" Fuc(I) Phänotyp darstellt.
Umwelt-und Lagerungsstabilität spielen beim Blutgruppengutachten eine wichtige Rolle. Die Isoenzympolymorphismen scheinen jedoch sehr umweltstabil zu sein, besonders gegenüber krankhaften Einflüssen.
Man muß allerdings vorsichtig bei Austauschtransfusionen von Neugeborenen sein, da die Auftrennungsmuster verfälscht sein können (RADAM et al, I977).
In dieser Richtung wurden bei der Fuc noch keine Untersuchungen durchgeführt.
Eine Lagerung der Proben in Form von Leukozyten-Pellets war ohne sichtbaren Aktivitätsverlust über einen Zeitraum von 6 Wochen möglich.
Nach Ergebnissen von SPINDLER (I978) konnte das Enzym sogar über 3 Monate und auch nach Postversand der Blutproben ausreichend analysiert werden.
Durch den Nachweis von Fuc-Aktivität im Neugeborenenalter ist eine weitere Forderung erfüllt, die gelegendlich bei Paternitätsfragen eine Rolle spielt.
Ein Erbgang gilt als gesichert, wenn mindestens 500 "kritische" Familien untersucht worden sind, die keine Abweichungen vom angenommenen Erbgang zeigen. "Kritisch" bedeutet, daß das festzustellende Merkmal reinerbig vorliegen muß.
Bei der Fuc ist die Zahl der bisher untersuchten Einzelpersonen (ca. I200) und Familien (ca.I00) noch sehr gering, so daß die formalgenetische Situation noch nicht völlig als gesichert gelten kann. Es fand sich jedoch in keinem Fall eine Abweichung vom angenommenen Erbgang und die Ergebnisse stimmten immer mit den Bedingungen des HARDY-WEINBERG-Gesetzes überein.
Das Problem eines sog. "stummen" Allels kommt auch in allen anderen standardmäßig untersuchten Systemen vor.

Damit ist auch im Fuc-System ein "falscher Homozygotie-ausschluß" (Vererbung eines $\underline{Fuc}^{O}$-Allels von Vater auf Kind: Mutter $Fuc^{I}Fuc^{I}$, Kind $Fuc^{I}Fuc^{O}$, Vater $Fuc^{2}Fuc^{O}$.) möglich.
Weitere Einschränkungen für die Aufnahme des Fuc-Systems ins Normgutachten sind das zeitaufwendige und sehr arbeitsintensive Verfahren der Isolierung und Darstellung des Enzyms, sowie die Einschränkung des Informationswertes durch die sehr enge Nachbarschaft zum Rh-System auf Chromosom A-I (ähnlich HLA/Bf auf Chromosom 6), wodurch sog. "Superhaplotypen" bei biostatischen Berechnungen berücksichtigt werden müssen (SPINDLER, I978).
Ein besonderes Problem ist die fotographische Darstellung der Phänotypen. Obwohl die Ablesung der Zymogramme keine Schwierigkeiten bereitete, war es technisch sehr schwierig geeignete Aufnahmen zu reproduzieren. Es mußte deshalb auf fotographische Abbildungen verzichtet werden.

Zusammenfassend muß die Anwendbarkeit des Fuc-Sytems für die Routine der Paternitätsserologie eingeschränkt werden. Sie ist - bei an sich günstiger Allelverteilung (isolierte Vaterschaftsausschlußchance von I5.3%) - lediglich als Zusatzgutachten bei besonderen Problemfällen geeignet und sollte durch ein Zweitgutachten bestätigt werden.
Zukünftige Einsatzmöglichkeiten der Fuc liegen allerdings nicht nur im Bereich der Paternitätsserologie, sondern auch auf Gebieten wie Spurenkunde und Genkartierung.
So könnte nach Ansicht von CORNEY et al (I977) die Fuc zu einer besseren Aufklärung der Feinstruktur der Rh-Region auf Chromosom A-I beitragen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Polymorphismus der Alpha-L-Fucosidase (E.C.3.2.I.5I) wurde an n = 468 Personen aus Nordrheinwestfalen mit der Isoelektrischen Fokussierung untersucht.
Es konnten die drei Phänotypen Fuc(I), Fuc(2-I) und Fuc(2) nachgewiesen werden.
Die Genfrequenzen betrugen: $\underline{Fuc}^{I}$ = 0.7447 und $\underline{Fuc}^{2}$ = 0.2553 .
Diese Werte zeigen eine enge Übereinstimmung mit den nach dem HARDY-WEINBERG-Gesetz zu erwarteten Zahlen.
Das Verhältnis der Beobachtungswerte zu den Erwartungswerten spricht bei einem Chi-Quadrat-Wert von 0.3638 für eine gute Reproduzierbarkeit der angewandten Methode.

Das angenommene Vererbungsmodell eines autosomal kodominanten Erbganges konnte durch Untersuchungen an I7 Familien bestätigt werden.
Der Einfluß von Alterung auf die Proben wurde über einen Zeitraum von 40 Tagen untersucht.
Es wurde eine Variante der Leukozytenisolation ausprobiert, um die Ergebnisse zu verbessern und die Blutmenge zu reduzieren.
Bei einem Vergleich der populationsgenetischen Daten fand sich eine enge Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren.
Die Anwendbarkeit des Fuc-Systems für die Routine der Paternitätsserologie wurde überprüft und muß eingeschränkt werden.

6. LITERATUR

I. Alhadeff, J.A., Miller, A.L., Wenaas, H., Vedvick, T. and O'Brien, J.S.: Human liver Alpha-L-Fucosidase. Biol. chem. J. 250, 7I06 (I975).

2. Alhadeff, J.A., Tennant, L. and O'Brien, J.S.: Isoenzyme patterns of human liver Alpha-L-Fucosidase during developement. Dev. Biol. 47, 3I9 (I975).

3. Alhadeff, J.A.: Alpha-L-Fucosidase isoenzyme patterns in the fetal human liver. Prot. Biol. Fluids. 24, II3 (I976).

4. Alhadeff, J.A., Janowsky, A.J.: Purification and properties of human brain Alpha-L-Fucosidase. J. Neurochem. 28, 423 (I977).

5. Alhadeff, J.A., Cimino, G., Janowsky, A.J.: Isoenzymes of human liver Alpha-L-Fucosidase: Chemical relationship, kinetic studies, and immunochemical characterization. Moll. Cell. Biochem. I9, I7I (I978).

6. Alhadeff, J.A., Janowsky, A.J.: Human serum Alpha-L-Fucosidase. Clin. Chim. Acta 82, I33 (I978).

7. Avila, J.L., Convit, J.: Studies on human polymorphonuclear leucocyte enzymes. IV. Intracellular distribution and properties of Alpha-L-Fucosidase. Bioch. Biophys. Acta 358, 308 (I974).

8. Beratis, N.G., Turner, B.M., Hirschhorn,K.: Fucosidosis: Detection of the carrier state in peripheral blood leucocytes. Pediatr. J. 87, II93 (I975).

9. Bugiani,O., Borrone, C.: Fucosidosis: A neuropathological study. Riv. path. Nerv. Ment. 97, I33 (I976).

IO. Butterworth, J., Guy, G.J.: Alpha-L-Fucosidase of human skin fibroblasts and amniotic fluid cells in tissue culture. Clin. Genet. I2, 297 (I977).

II. Chester, M.A., Hultberg, B., Sjoebland, S.: A comparison of Alpha-L-Fucosidase activities of human liver and serum. Biochim. Biophys. Acta 485, I47 (I977).

I2. Christomanou, H., Cap, C., Sandhoff, K.: Isoelectric focusing pattern of acid hydrolases in cultured fibroblasts, leucocytes and cell-free amniotic fluid. Neuropädiatrie 8, 238 (I977).

I3. Cook, P.J.L., Noades, J.E., Newton, M.S.R.: On the orientation of the Rh/El_I-linkage group. Ann. Hum. Genet. 4I, I57 (I977).

I4. Corney, G., Fischer, R.A., Cook, P.J.L., Noades, J.E., Robson, E.: Linkage between Alpha-L-Fucosidase and the rhesus blood group. Ann.Hum. Genet. 40, 403 (I977).

I5. Dawson, G., Spranger, J.W.: Fucosidosis: A glycosphingolipidosis. N. Engl. J.M. 285, I22 (I97I).

I6. Dawson, G., Matalon, R., Dorfman, A.: Glycosphingolipids in cultured skin fibroblasts. II. Characterization and metabolism in fibroblasts from patients with inborn errors of glycosphingolipid and mucopolysaccharide metabolismen. J. Biol. Chem. 247, 595 (I972).

I7. Dawson, G., Tsay, G.C.: Fucosidosis. Adv.Exp.Med. Biol. 68, I87 (I976).

I8. Dawson, G., Tsay, G.C.: Substrate specifity of human Alpha-L-Fucosidase. Arch. Biochem. Biophys. I84, I2 (I977).

I9. Di Matteo, G., Durand, P., Gatti, R., Maresca, A., Orfeo, M., Urbano, F., Romeo, G.: Single residual enzymatic form in Fucosidosis. Biochem. Biophys. Acta 429, 538 (I976).

20. Di Matteo, G., Orfeo, M., Romeo, G.: Human Alpha-L-Fucosidase. Purification and properties. Biochem. Biophys. Acta 429, 527 (I976).

21. Durand, P., Borrone, C., Della Cella, G.:
A new mucopolysaccharide lipid storage disease?
Lancet 2, 1024 (1966).

22. Durand, P., Borrone, C., Della Cella, G.:
Fucosidosis. Lancet I, 1198 (1968).

23. Durand, P., Borrone, C., Della Cella, G.:
Fucosidosis. J. Pediatr. 75, 665 (1969).

24. Durand, P., Borrone, C.: Fucosidosis and mannosidosis
glycoprotein and glycosylceramide storage disease.
Helv. Paediatr. Acta 26, 19 (1971).

25. Freitag, F., Küchemann, K., Blümcke, S.:
Hepatic ultrastructure in Fucosidosis. Virch. Arch. B.
Zellpath. 7, 99 (1971).

26. Gatti, R., Borrone, C., Trias, X., Durand, P.:
Genetic heterogeneity in Fucosidosis. Lancet 2,
1024 (1973).

27. Harris, H., Hopkinson, D.A.: Handbook of enzyme
electrophoresis in human genetics.
Amsterdam: North Holland (1976).

28. Hirschhorn, K., Beratis, N.G., Turner, B.M.:
Alpha-L-Fucosidase in normal and deficient individuals.
Adv. Exp. Med. and Biol. 68, 205 (1976).

29. Kolibaba, L.G., Rosenfeld, E.L., Wiederschain, G.Y.:
Alpha-L-Fucosidase activity in human blood.
Vopr. Med. Khim. 21, 637 (1975).

30. Kömpf, J.: Zur Methodik und Formalgenetik der
Alpha-L-Fucosidase. Vortrag II. ital.-deutscher
Workshop "Forensische Hämogenetik", Meran (1980).

31. Kousseff, B.G., Beratis, N.G., Danesino, C.,
Hirschhorn, K.: Genetic heterogeneity in Fucosidosis.
Lancet 2, 1387 (1973).

32. Kousseff, B.G., Beratis, N.G., Strauss, L., Brill, P.W., Rosenfield, R.E., Kaplan, B., Hirschhorn, K.: Fucosidosis type 2 . Pediatr. 57, 205 (I976).

33. Levvy, G.A., McAllan, A.: Mammalian Fucosidases Biochem. J. 80, 435 (I96I).

34. Libert, J., van Hoof, F., Tondeur, M.:Fucosidosis: Ultrastructural study of conjunctiva and skin and enzyme analysis of tears. Invest. Ophthalmol. I5, 626 (I976).

35. Loeb, H., Tondeur, M., Jonniaux, G., Mockel-Pohl, S., Vamos-Hurwitz, E.: Biochemical and ultrastructural studies in a case of Mucopolysaccharidosis "F" (Fucosidosis). Helv. Paediatr. Acta 36, 5I9 (I969).

36. Madsuda, I., Arashima, S., Anakura, M., Oka, Y.: Alpha-L-Fucosidase and Alpha-D-Mannosidase activity in the white blood cells in the disease and in the carrier state of Fucosidosis. Clin. Chim. Acta 48, 9 (I973).

37. Madsuda, I., Arashima, S., Oka, Y., Mitsuyama, T., Ariga, S., Ikeuchi, T., Ichida, T.: Prenatal diagnosis of Fucosidosis. Clin. Chim. Acta 63, 55 (I975).

38. Patel, V., Watanabe, I., Zeman, W.: Deficiency of Alpha-L-Fucosidase. Science I76, 426 (I972).

39. Patel, V., Zeman, W.: Variability of expressivity of Alpha-L-Fucosidase-Deficiency. Adv. Exp. Med. Biol. 68, I67 (I976).

40. Price, R.G., Thorpe, R., Tucher, S.M., Philips, N.C.: Activity of N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase, Alpha-L-Fucosidase and Alpha-D-Mannosidase in the urin of normal individuals and patiens with renal disease. Biochem. Soc. Trans. 5, 248 (I977).

4I. Radam, G.: Fortschritte der Hämatologie. Band 4, I85 (I977).

42. Rao, D.C., Keats, B.J., Lalouel, J.M., Morton, N.E.: A maximum likelihood map of chromosome I. Am. J. Hum. Genet. 31, 680 (1979).

43. Robinson, D., Thorpe, R.: Human liver Fucosidase. Clin. Chim. Acta 47, 403 (1973)

44. Scharfmann, A., Houdret, N., Roussel, P., Biserte, G., Aerts, C., Tonnel, A.B., Voisin, C.: Etude comparative des hydrolases acides des leucocytes humains et des macrophages alveolaires de l'homme et du cobage. Clin. Chim. Acta 63, 369 (1975).

45. Shzukuischi, S., Nahamura, R., Tsunemitsu, A., Uesugi, Y.: Alpha-L-Fucosidase activity in human saliva and dental plaque. Arch. oral Biol. 22, 721 (1977).

46. Skoog, W.A., Beck, W.S.: Studies on fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leucozytes. Univers. of Calif. (1955).

47. Spindler, F.: Untersuchungen zum Polymorphismus der Alpha-L-Fucosidase in der Hessischen Bevölkerung. Inaugural Dissertation, Frankfurt a. M. (1978).

48. Strecker, G., Fournet, B., Spik, G., Montreuil, J., Durand, P., Tondeur, M.: Structures of 9 oligosaccharides and glycopeptides containing large amounts of fucose excreted in the urine of 2 patients with Fucosidosis. CR ACAD SCI (D) (Paris) 248, 85 (1977).

49. Schwerd, W.: Rechtsmedizin. Deutscher Ärzte-Verlag, 124 (1975).

50. Troost, J., van der Heijden, M.C.M., Staal, G.E.J.: Human leucocyte Alpha-L-Fucosidase. Clin.Chim. Acta 73, 321 (1976).

51. Troost, J., van der Heijden, M.C.M., Staal, G.E.J.: Characterization of Alpha-L-Fucosidase from two different families with Fucosidosis. Clin. Chim. Acta 73, 329 (1976).

52. Troost, J., Staal, G.E.J., Willemse, J., van der Heijden, M.C.M.: Fucosidosis I. Clinical and enzymological studies. Neuropaediatrie 8, I55 (I977).

53. Troost, J., Straks, W., Willemse, J.: Fucosidosis II. Ultrastructure. Neuropaediatrie 8, I63 (I977).

54. Turner, B.M., Beratis, N.G., Turner, V.S., Hirschhorn, R.: Isoenzymes of human Alpha-L-Fucosidase detectable by starch gel electrophoresis. Clin. Chim. Acta 57, 29 (I974).

55. Turner, B.M., Beratis, N.G., Turner, V.S., Hirschhorn, R.: Polymorphism of human Alpha-L-Fucosidase. Am. J. Hum. Genet. 27, 65I (I975).

56. Turner, B.M., Beratis, N.G., Turner, V.S., Hirschhorn, R.: Silent allele as genetic basis of Fucosidosis. Nature 257, 39I (I975).

57. Turner, B.M., Smith, M., Turner, V.S., Kucherlapati, R.S., Ruddle, F.H., Hirschhorn, R.: Assignment of the gene locus for human Alpha-L-Fucosidase to chromosome I by analysis of somatic cell hybrids. Somatic. cell. Genet. 4, 45 (I978).

58. Van Hoof, F., Hers, H.G.: Mucopolysaccharidosis by absence of Alpha-L-Fucosidase. Lancet I, II98 (I968).

59. Van Hoof, F., Hers, H.G.: The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidosis. Europ. J. Biochem. 7, 34 (I968).

60. Van Hoof, F.: Fucosidosis in "lysosomes and storage disease". Academic Press, 277 (I973).

6I. Voelz, C., Tolksdorf, M., Freitag, F., Spranger, J.: Fucosidosis. Mschr. Kinderheilk. II9 Bd., Heft 7 353 (I97I).

62. Wiederschain, G.Y., Rosenfeld, E.L.: Two forms of Alpha-L-Fucosidase from pig kidney and their action on natural oligosaccharides. Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, I008 (I97I)

63. Wiederschain, G.Y., Rosenfeld, E.L., Brusilowsky, A., Kolibaba, L.G.: Alpha -L-Fucosidase and other glycosidases in human plazenta, foetus liver and amniotic fluid at various stages of gestation. Clin. Chim. Acta 35, 99 (I97I).

64. Wiederschain, G.Y., Kolibaba, L.G., Rosenfeld, E.L.: Human Alpha-L-Fucosidases. Clin. Chim. Acta 46, 305 (I973).

65. Wiederschain, G.Y., Prokpenkow, A.P.: Fractionation of Alpha-L-Fucosidase from pig kidney by gel filtration and isoelectric focusing. Biokhimiya 40, 808 (I975).

66. Wiederschain, G.Y., Bujer, E.M.: Alpha-L-Fucosidase activity of human and pig kidney: A property of Alpha-D-Galactosidase. Arch. Biochem. Biophys. I82, 335 (I977).

67. Woods, S.: Plasma Alpha-L-Fucosidase: Presence of a low activity in some normal individuals. J. Lab. Clin. Med. 88, 469 (I976).

68. Zielke, K., Veath, M.L., O'Brien, J.S.: Fucosidosis: Deficiency of Alpha-L-Fucosidase in cultured skin fibroblasts. J. Exp. Med. I36, I97 (I972).

69. Zielke, K., Okada, S., O'Brien, J.S.: Fucosidosis: Diagnosis by serum assay of Alpha-L-Fucosidase. J. Lab. Clin. Med. 79, I64 (I972).

Herrn Prof.Dr.H.Schweitzer möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die großzügigen Möglichkeiten zur Durchführung dieser Arbeit danken.

Hernn Dr.J.Henke danke ich für seinen kritischen Rat in zahlreichen Gesprächen und für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof.Dr.H.T.Brüster gilt mein besonderer Dank für die verständnisvolle zur Verfügungstellung eines großen Teils der Blutproben.
Den Mitarbeitern des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin möchte ich ebenfalls für ihre Mithilfe danken.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin, insbesondere bei Frau Flach, für ihre Unterstützung bei den praktischen Versuchen bedanken.

Lebenslauf

Name	Netzer Thomas
geboren	am 30.04.1955 in Bremen
Eltern	Netzer Ernst und Lucie, geb. Werner
Schulausbildung	1962 - 1964 Volksschule Ottersberg/Bremen 1964 - 1966 Volksschule Kaarst 1966 - 1975 Albert-Einstein-Gymnasium Kaarst Abschlußprüfung: Abitur
Berufsausbildung	1975 - 1981 Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf Staatsexamen voraussichtl.Okt.1981